

 **LMU**
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Biologie, Dept I, Botanik • Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop

Gesund durch Tabak!

Zur Erzeugung von
Pharma-Proteinen in Pflanzen

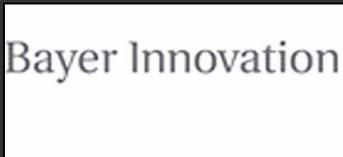
Seniorenstudium 16. Juli 2007



Gesund durch Tabak



Icon Genetics AG, Research Centre Halle (Saale)
Icon Genetics AG, Research Centre Freising

© Hans-Ulrich Koop

Gesund durch Tabak

Gliederung

Pflanzen sind anders: Unterschiede in der Biologie
Gentransfer bei Pflanzen: drei verschiedene Plattformen

- Zellkern
- Plastide
- virale Expression
 - klassisch
 - Magnicon®-Technologie

© Hans-Ulrich Koop

Gesund durch Tabak

Pflanzen sind anders

sie können nicht weglaufen



Anpassung vor allem durch
"sekundäre Pflanzenstoffe":

Phenole, Alkaloide, Terpene, Flavonoide, Saponine

Pflanzen sind dem Chemiker
weit überlegen;

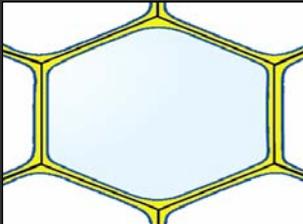
Gentechnologie könnte dies noch
verstärken

© Hans-Ulrich Koop

Gesund durch Tabak

Pflanzen sind anders

ihre Zellen sind unbeweglich



sie sind von einer Zellwand
umgeben, die den benachbarten
Zellen gemeinsam ist

die Zellwand (v.a. Zellulose)
gibt der Pflanze Stabilität

wir nutzen sie als z.B. als Holz

Gentechnologie könnte diese
Ressource besser nutzen

© Hans-Ulrich Koop

Gesund durch Tabak

Pflanzen sind anders

man kann von ihnen Stecklinge machen



Neubildung von Wurzeln

Neubildung von Sprossen

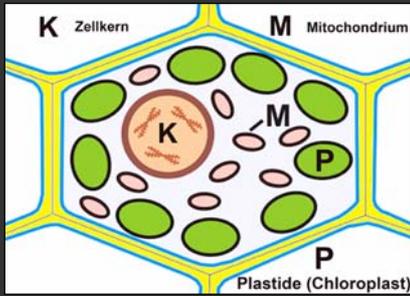
Neubildung von allen Geweben

und dies sogar aus einzelnen
isolierten Zellen

100 000ende "Pflanzen-Dollies":
technisch kein Problem

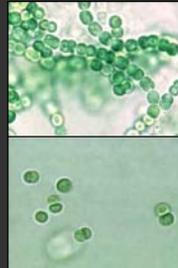
© Hans-Ulrich Koop

Pflanzen sind anders sie enthalten drei genetische Programme



© Hans-Ulrich Koop

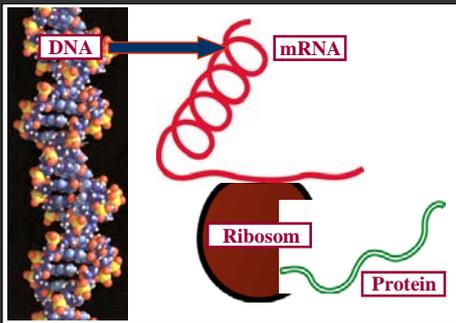
Pflanzen sind anders sie enthalten drei genetische Programme



- Zellkern
ca. 26.000 Gene
- Mitochondrien
ca. 25 Gene
- Plastiden
ca. 150 Gene
- Bakterien (Blualgen)
ca. 3500 Gene

© Hans-Ulrich Koop

DNA → RNA → Protein



© Hans-Ulrich Koop

Produktion von rekombinantem Protein

Warum gerade Pflanzen?



unbegrenzte Produktionskapazität, niedrige Investitionen,
niedrige Produktionskosten, ökologisch unbedenklich,
keine humanpathogenen Viren, keine Prionen

© Hans-Ulrich Koop

technische Enzyme



nachwachsende Rohstoffe

Diagnostika
Impfstoffe
Therapeutika

bessere agromische Eigenschaften

gesündere Nahrungs- und Futterpflanzen

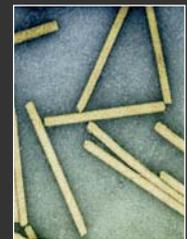
© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen

Zellkern

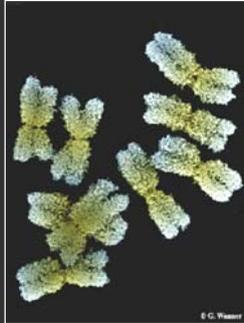
Plastide

virale Expression



© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

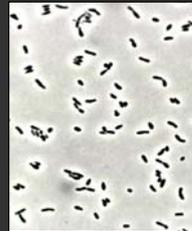


© Hans-Ulrich Koop

E. C. Weiler

Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

Agrobacterium tumefaciens
tumormachendes Bodenbakterium



ein kleines Bakterium
macht es uns seit
Millionen von Jahren vor,
wie es geht

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

Agrobacterium tumefaciens



Tumoren
durch bakterielle
Gentechnologie

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

Agrobacterium tumefaciens

“Genetische Manipulation“ der Pflanzenzelle

Synthese von pflanzlichen
Wachstumshormonen → Wucherung

Synthese von Speicherstoffen, die vom
Agrobacterium verwertet werden können

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

Agrobacterium tumefaciens
ein “geniales“ System

- Injektion von DNA (T-DNA) in die Pflanzenzelle
- Schutz von Abbau in der Pflanzenzelle
- gezielter Transport in den Zellkern
- Integration in die Kern-DNA
- Genschalter, die im Zellkern aktiv sind

© Hans-Ulrich Koop

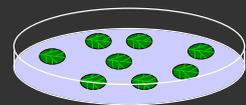
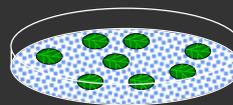
Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

Agrobacterium tumefaciens

Durchführung 1:

1. Inkubation von Blattstückchen
mit Agrobakterien

2. Abtötung der Agrobakterien
(Antibiotikum)



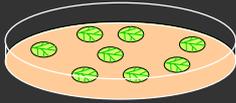
© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

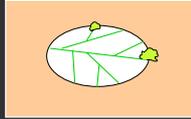
Agrobacterium tumefaciens

Durchführung 2:

3. Kultur in Gegenwart von Selektionsmittel (Antibiotikum, Herbizid)



4. Kultur in Gegenwart von Selektionsmittel lokale Bildung von Kallus



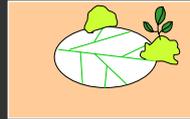
© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

Agrobacterium tumefaciens

Durchführung 3:

5. Kultur in Gegenwart von Selektionsmittel Sprossbildung



6. Bewurzelung



7. Übertragung in Erde

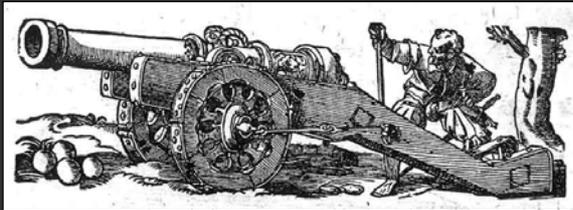


© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Zellkern

Andere Verfahren

Die Genkanone



"Nachtigal", 30-jähriger Krieg

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Plastide



© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Plastide Verfahren



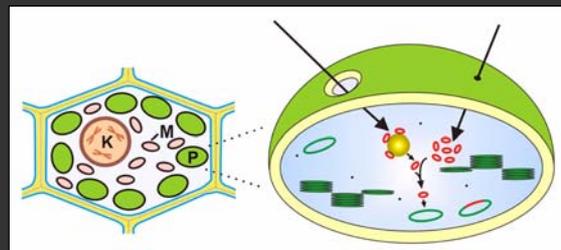
Genkanone



Protoplasten/PEG

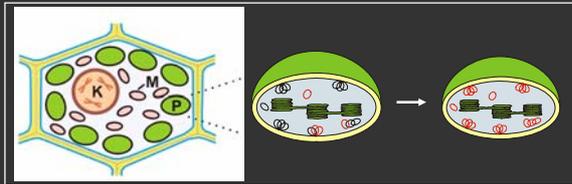
© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Plastide Verfahren



© Hans-Ulrich Koop

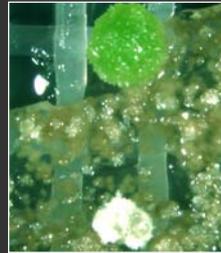
Gentransfer bei Pflanzen: Plastide Selektion



heteroplasmisch → homoplasmisch

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Plastide Selektion



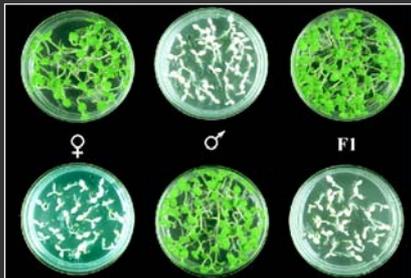
Streptomycin/Spectinomycin
Kanamycin



Pigmentierung

© Hans-Ulrich Koop

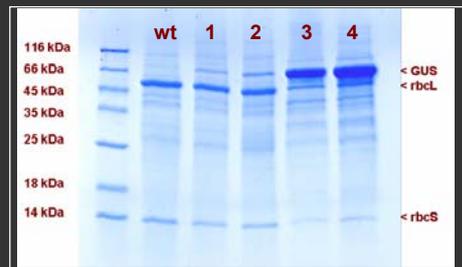
Gentransfer bei Pflanzen: Plastide Vorzüge



Plastidäre Gene gehen nicht auf Wanderschaft

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Plastide



bis zu 50 % des gesamten löslichen Proteins

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Plastide

biologische Sicherheit

(fast) keine Vererbung durch den Pollen, (fast) keine unerwünschte Ausbreitung

hohe Ausbeute an Genprodukt

10 000 Kopien pro Zelle; bis 50% des löslichen Proteins der Zelle

hohe Präzision

gezielte Insertion; keine Positionseffekte

stabile Produktivität

keine Geninaktivierung ('gene silencing')

Sorteneigenschaften bleiben erhalten

neue Gene nicht im Zellkern

keine Antibiotika-Resistenzgene

automatische Entfernung

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Plastide in Plastiden exprimierte pharmazeutische Proteine (Auswahl)

Medikamente

versch. Interferone

Somatotropin

Serumalbumin (HSA)

Immunmodulator, Krebstherapie

Behandl. von Wachstumsstörungen

Blutersatzstoff

Impfstoffe

Tetanus-Toxinfragment

enterotoxigenes Protein

Cholera-Toxinfragment

Parvovirus-Hüllprotein

Potavirus-Hüllprotein

Impfung gegen Wundstarrkrampf

Schutz vor Gastroenteritis

Impfung gegen Cholera

Impfung gegen Röteln

Impfung gegen Diarrhoe

© Hans-Ulrich Koop

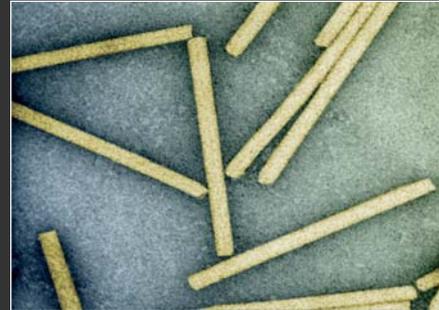
Gentransfer bei Pflanzen: Plastide



Feldversuch 2005:
Tabak mit pharmazeutischem Protein "PAL" (Phenylketonurie)
Kentucky Tobacco Research and Development Center

Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression klassischer Ansatz: vollständiger Virus



Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression klassischer Ansatz: vollständiger Virus



Ausbeute!
vollständige Umprogrammierung
des Wirtes
bis 80% TSP

Hans-Ulrich Koop

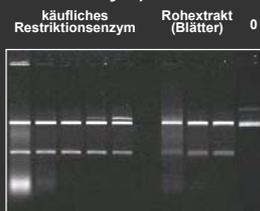
Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression klassischer Ansatz: vollständiger Virus

toxische Proteine (Restriktionsenzym)

Nicotiana benthamiana



5 d nach Inokulation



Konzentration
Aktivität: 20.000 U/g FW

Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression klassischer Ansatz: vollständiger Virus

- Vorzüge (theoretisch)**
- keine transgenen Pflanzen
 - Viren werden sehr schnell abgebaut
 - sehr hohe Ausbeuten
 - sehr schnelle Produktion
 - Wachstum und Produktion getrennt
 - Produktion toxischer Proteine möglich

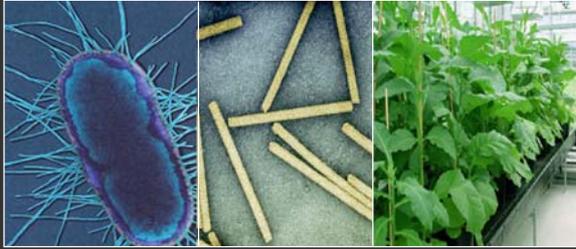
Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression klassischer Ansatz: vollständiger Virus

- Probleme**
- biologische Sicherheit
 - nur ein Protein pro Zelle
 - nur kleine Proteine : 1kbp = 26,4 kDa
 - Ausbreitung in der Pflanze schwierig
 - genetisch veränderte Viren instabil
 - Produktionsmaßstab (scale up) klein

Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie



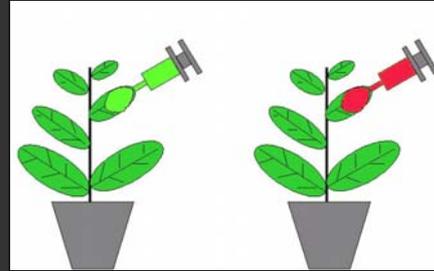
A. tumefaciens

TMV

Tabak

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie



Agro-Infiltration

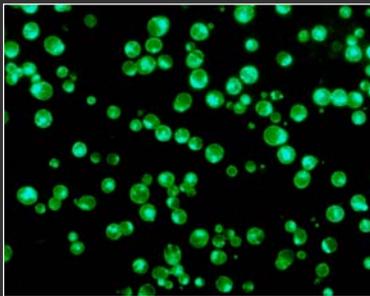
© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie

Agrobacterium tumefaciens

Gentransfer hocheffizient

> 90% der Zellen zeigen transiente Expression



© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie

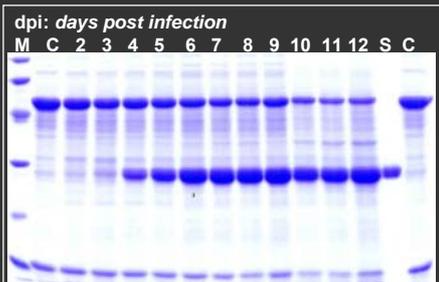
T-DNA mit einer Kopie (cDNA) des Virusgenoms "Agroinfektion"



"Pro-Amplicon", "viraler Pro-Vector" > 6000 Nukleotide

© Hans-Ulrich Koop

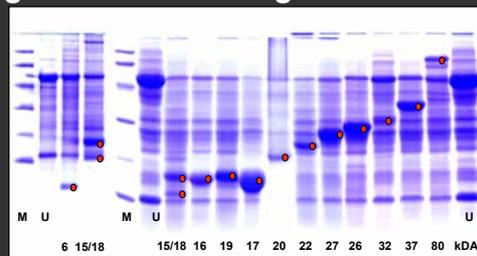
Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie



Expression von GFP in *Nicotiana tabacum*

© Hans-Ulrich Koop

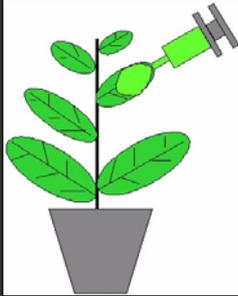
Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie



Expression verschiedener Pharma- und Modell-Proteine

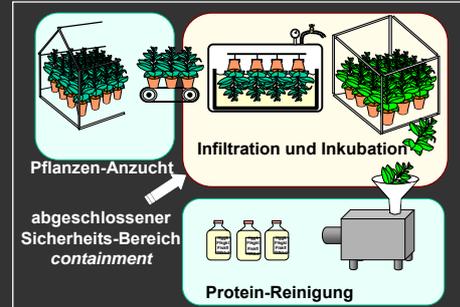
© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie



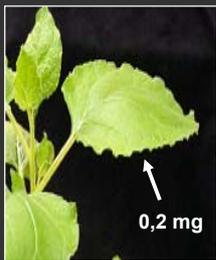
© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie



© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie



0,2 mg IFN α pro Gramm Blatt (5% TSP)
ein Blatt reicht für die Therapie eines
Hepatitis C-Patienten für einen Monat
(ca. 2.500 \$)

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie

- grüne Gentechnik: aber sicher!
- kein intakter Virus
- keine transgene Pflanze
- Inokulation im abgeschlossenen Bereich
- keine Bildung von Pollen oder Samen
- keine Durchmischung mit Nahrungspflanzen
- keine Durchmischung mit Futterpflanzen
- genetisch defekte *Agrobacterien*

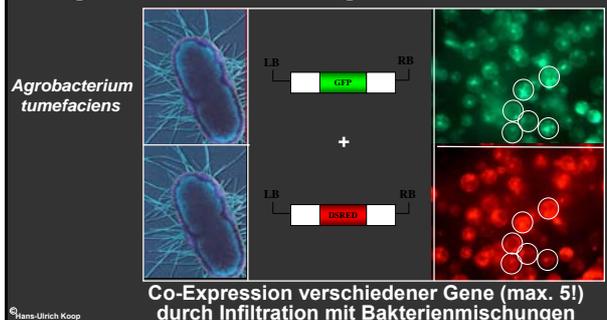
© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie

- 6 Interferone, Wachstumshormone, Wachstumsfaktoren
- 15 Einzelketten-Antikörper, Antikörper-Fusionen, monoklonale Antikörper
- 16 bakterielle Antigene, virale Antigene, Antigen-Mutanten, und -fusionen, Adjuvantien, Epitop-Träger
- 6 Enzyme and Enzym-Inhibitoren tierischer, pflanzlicher mikrobieller oder viraler Herkunft
- 8 weitere Proteine
- >50 Proteine menschlicher, tierischer, pflanzlicher, bakterieller, oder viraler Herkunft
darunter viele potenzielle Medikamente

© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie



© Hans-Ulrich Koop

Gentransfer bei Pflanzen: Virale Expression Magnicon®-Technologie

Probleme, klassischer Ansatz

- ✓ biologische Sicherheit
- ✓ nur ein Protein pro Zelle
- ✓ nur kleine Proteine : 1kbp = 26,4 kDa
- ✓ Ausbreitung in der Pflanze schwierig
- ✓ genetisch veränderte Viren instabil
- ✓ Produktionsmaßstab (scale up) klein

© Hans-Ulrich Koop

Icon Genetics AG, Research Centre Freising

Christian Eibl
Monika Füssl
Timothy Golds
Stefan Herz
Stefan Mühlbauer
Conny Stettner



Anatoli Giritch
Yuri Y Gleba
Victor Klimyuk
Romy Kandzia
Sylvestre Marillonnet
Carola Thüringer
Stefan Werner

Icon Genetics AG, Research Centre Halle (Saale)

© Hans-Ulrich Koop

www.icongenetics.com